Anyplex™ II
STI-7 Detection (V1.1)

Seegene

Anyplex™ II

CE

STI-7 Detection (V1.1)

Sistema de PCR Anyplex™ II para la detección de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Ureaplasma parvum* (UP) y *Trichomonas vaginalis* (TV) a partir de muestras de orina, hisopados (uretral, vaginal y de cuello uterino) y citologías en base líquida.

Para su uso con el

1. **Sistema de PCR en Tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad)**

CE

IVD **(Uso para Diagnostico In Vitro)**

TABLA DE CONTENIDOS

NOTIFICACIONES…….. 3

USO PREVISTO……... 4

PRINCIPIOS Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO…… 4

ANTECEDENTES…… 6

REACTIVOS…… 7

MANEJO Y ALMACENAMIENTO…… 8

MATERIAL REQUERIDO NO INCLUÍDO……..

PROTOCOLO…… 10

PROGRAMACIÓN DEL EQUIPO PARA PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS……... 16

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS…… 27

DESEMPEÑO……

REFERENCIAS…….. 28

SIMBOLOGÍA…… 29

INFORMACIÓN DE PEDIDO……... 30

NOTIFICACIONES

El usuario siempre deberá poner atención a lo siguiente:

- Este producto se puede utilizar con propósitos de diagnóstico *in vitro* (IVD, *In Vitro Diagnostics*) en UE dado que la marca IVD CE está aprobada por la Directiva UE (98/79/EC).
- Los tipos de muestras aplicables son: orina, hisopados (uretrales, vaginales y cervicales) y muestras de citología en base líquida. Esta prueba no se ha validado para otro tipo de muestras.
- Las muestras de ADN deben almacenarse a -70°C hasta su uso y mantener en hielo durante el uso.
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir en muestras que son repetidamente congeladas y descongeladas o almacenadas por largos periodos de tiempo.
- La confiabilidad de los resultados depende de la recolección adecuada de la muestra, el transporte, almacenamiento y procesamiento.
- Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de ingresar a las diferentes áreas. Cambie los guantes inmediatamente si se contaminan o trátelos con reactivo DNA decontaminante.
- Dedicar suministros y equipo a las áreas de trabajo separadas y no moverlos de un área a otra.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba o fume en las áreas de trabajo del laboratorio. Use guantes desechables libres de polvo, bata de laboratorio y gafas protectoras cuando manipule muestras y reactivos. Lave las manos después de manipular muestras y los reactivos de la prueba.
- Evite contaminar los reactivos al extraer alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda el uso de puntas para pipetas estériles, desechables y con filtro resistente a aerosoles.
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes o de tubos diferentes del mismo lote.
- No use este producto después de la fecha de vencimiento.
- Use tubos de tapa rosca y evite las salpicaduras o contaminación cruzada de muestras durante la preparación.
- Se cuidadoso para no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraidos, productos de la PCR, y control positivo. Para prevenir la contaminación delos reactivos, se recomienda usar puntas con filtro.
- Use áreas separadas para cada experimento.
- Use un set diferente de pipetas para cada área: extracción de ADN, mezcla de reactivos, y post-PCR.
- Después de la amplificación abra los tubos o tiras de reacción en la zona de post-PCR, para evitar contaminación con amplicones.
- Almacene el material positivo aparte de los reactivos del kit.
- Los procedimientos de seguridad en el laboratorio se deben tener en cuenta para manipular las muestras.

- Limpie y desinfecte a fondo todas la superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0.5% (en agua desionizada o destilada)

USO PREVISTO

La prueba STI-7 Detection de Anyplex™ II es un ensayo cualitativo *in vitro* para la detección de *C. trachomatis* (CT), *N. gonorrhoeae* (NG), *M. genitalium* (MG), *M. hominis* (MH), *U. urealyticum* (UU), *U. parvum* (UP) y *T. vaginalis* (TV) a partir de muestras de orina, hisopados uretrales, vaginales y cervicales) y citologías en base líquida.

PRINCIPIOS Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO

1. Principios

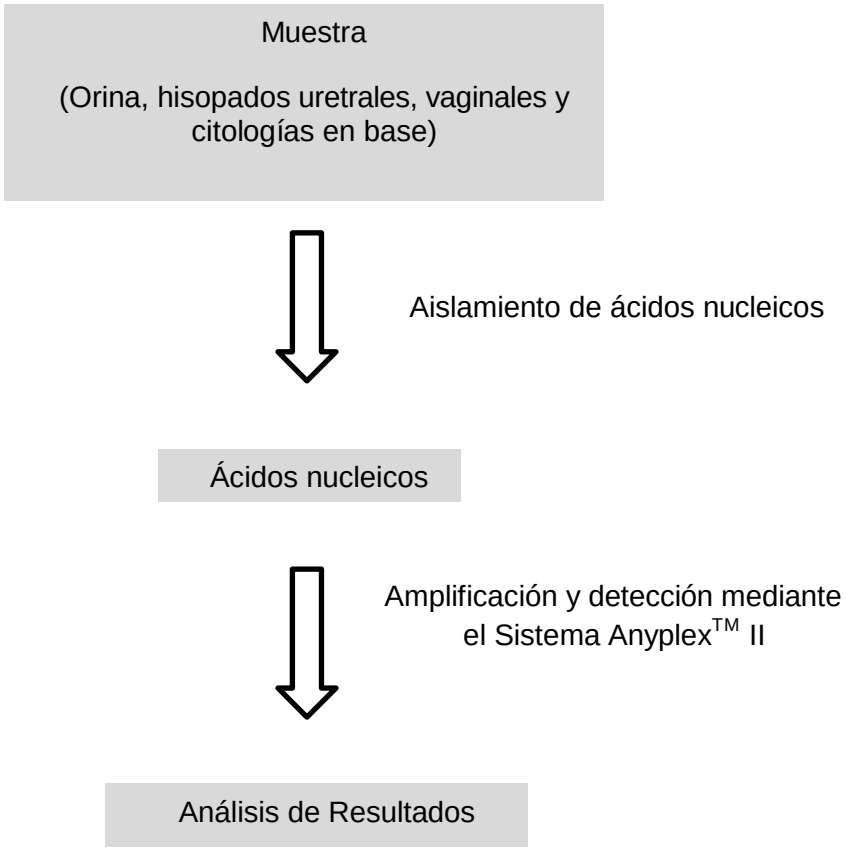
La prueba de detección STI-7 de Anyplex™ II es representativa de la tecnología de Seegene y está basada en la nueva tecnología TOCE™, la cual permite detectar múltiples patógenos en un solo canal de fluorescencia en los instrumentos para PCR en tiempo real.

En los ensayos de curvas de disociación actuales, se observan con frecuencia diferencias de temperatura entre los ADN que muestran una gran variación en sus secuencias, lo que resulta problemático en el área de diagnóstico clínico, donde es crítica la exactitud y reproducibilidad de las pruebas. No obstante, la tecnología TOCE™ está diseñada para no verse afectada por variaciones en la secuencia, por lo tanto, garantiza valores de Tm consistentes.

La prueba de detección STI-7 de Anyplex™ II representa una nueva clase de prueba molecular por CMTA-cíclico que es un un multiplexado. Este método puede discriminar más patógenos en muestras co-infectadas. El Anyplex™ II es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real que permite la amplificación, detección y diferenciación simultánea del material genético de *C. trachomatis* (CT), *N. gonorrhoeae* (NG), *M. genitalium* (MG), *M. hominis* (MH), *U. urealyticum* (UU), *U. parvum* (UP), *T. vaginalis* (TV) y el Control Interno (*Internal Control*, IC).

La eficiencia en un ensayo de PCR se ve reducida por inhibidores que pueden estar presentes en las muestras clínicas. Debido a lo anterior, se ha incorporado un control interno (IC) al producto para que funcione como un control exógeno global con el fin de monitorear el proceso de aislamiento de ácidos nucleicos y para verificar una posible inhibición de la PCR. El control interno es co-amplificado junto al material genético de las muestras clínicas.
Además, se utiliza el Uracil-DNA glicosilasa (UDG) para evitar la mutagénesis por eliminación del uracil de las moléculas de ADN por escisión del N-glicosilico unido e inicia la vía de reparación por escisión de base (VER). Este sistema es usado para el control de la contaminación cruzada de la muestra con amplicones.

2. Procedimiento


Muestra
(Orina, hisopados uretrales, vaginales y citologías en base)
Aislamiento de ácidos nucleicos
Ácidos nucleicos
Amplificación y detección mediante el Sistema Anyplex™ II
Análisis de Resultados

< Procedimiento general con el kit Anyplex™ II STI-7 Detection >

ANTECEDENTES

C. trachomatis, *N. gonorrhoeae* y *T. vaginalis* son los 3 principales patógenos de Enfermedades de Transmisión Sexual (*Sexual Transmision Diseases*, STD). En las mujeres, *C. trachomatis* ocasiona cervicitis, uretritis, endometritis y salpingitis. Una infección crónica con *C. trachomatis* puede resultar en cicatrización de las trompas de Falopio, infertilidad y embarazo ectópico. *N. gonorrhoeae* es el agente causal de la gonorrea y sin tratamiento, puede ocasionar vulvovaginitis y enfermedad inflamatoria pélvica. *T. vaginalis*, un parásito protozoario, es el agente causal de la tricomoniasis. Una infección con *T. vaginalis*, puede ocasionar vaginitis, cervicitis y uretritis. Estos tres patógenos también son una causa significativa de leucorrea en las mujeres.

Los Micoplasmas son bacterias pequeñas (0.2 – 0.3 nm), sin pared celular y son organismos intracelulares obligados. Las variedades más comunes que se observan en el tracto genital son *U. urealyticum*, *M. hominis* y *M. genitalium*. Los niños pueden ser colonizados con micoplasmas genitales en el momento del nacimiento. Después de la pubertad, la colonización con micoplasmas ocurre principalmente a través del contacto sexual. Los micoplasmas genitales se aíslan en mujeres embarazadas aproximadamente con la misma frecuencia que en mujeres no embarazadas con la misma frecuencia de actividad sexual. Los micoplasmas y ureaplasmas son fuertemente asociados con infertilidad, infección intraamniótica, infección post-parto, enfermedad inflamatoria pélvica (*Pelvic Inflammatory Disease*, PID) y corioamnionitis histológica.

El estándar actual para las infecciones de transmisión sexual (*Sexually Transmitted Infection*, STI) implica el uso de pruebas individuales para la detección de cada uno de los patógenos posibles. La mayoría de las pruebas comerciales se enfocan en la detección de las dos principales bacterias causantes de STI: CT y NG. Sin embargo, ya que la mayoría de las STI no presentan síntomas notables, la detección de una gama amplia de patógenos es de suma importancia. Una complicación adicional en el diagnóstico de las STI se debe a que diferentes patógenos pueden ocasionar síntomas similares, pero el régimen de tratamiento con antibiótico varía dependiendo del microorganismo causante de la enfermedad. La detección simultánea y precisa en las pruebas de STI es la clave en la resolución de estos problemas y en una atención efectiva y de bajo costo para el paciente.

REACTIVOS

Los reactivos contenidos en un kit son suficientes para 50 reacciones.

Información de compra Anyplex™ II STI-7 Detection (REF SD7700Y)

Anyplex™ II STI-7 Detection			
Símbolo	**Contenido**	**Volumen**	**Descripción**
Primer	4X STI-7 TOM	250 μL	Mezcla de Oligos (TOM): ➢ Reactivos para la amplificación y detección
Premix	4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)	250 μL	➢ DNA Polimerasa ➢ Uracil-DNA glicosilasa (UDG) ➢ Buffer con dNTPs
CONTROL +	STI-7 PC	25 μL	Control Positivo (PC): ➢ Mezcla de clones de los patógenos
Water	Agua libre de RNasa	1000 μL	Calidad ultra-pura, grado PCR
CONTROL IC	STI-7 IC	500 μL	Control Interno Exógeno (IC):
	Manual de usuario		

Anyplex™ II es una marca registrada de Seegene Inc.

MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Los componentes de Anyplex™ II STI-7 Detection deben almacenarse a -20° C. todos los componentes son estables hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas. El congelamiento y descongelamiento repetido debe evitarse ya que podría reducir la sensibilidad. Si los reactivos serán usados de manera intermitente, deberán almacenarse en alícuotas.

MATERIAL REQUERIDO NO INCLUÍDO

- Guantes desechables libres de talco (látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas estériles
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml
- Kit para aislamiento de ácidos nucleicos (ver Aislamiento de Ácidos Nucleicos)
- Proteinasa K
- Máquina de hielo
- Centrífuga de mesa
- Agitador *vórtex*
- Equipo para PCR en tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos de bajo perfil de 0.2 ml sin tapas (color blanco, No. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tapas planas de grado óptico (No. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
- Solución PBS 1X (pH 8.0)

PROTOCOLO

1. Toma de Muestra, Almacenamiento y Transporte

Nota: Todas las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas. Solo los materiales de muestras son permitidos, los cuales son recolectados, transportados y almacenados atendiendo estrictamente con las siguientes reglas e instrucciones.

Nota: para asegurarla calidad de las muestra, las muestras deben transportadas lo más pronto posible. Deben ser transportadas siguiendo las indicaciones de temperatura.

A. Toma de muestra

Muestras de Orina

- Los pacientes no deberán orinar en al menos las dos horas previas a la toma de muestra.
- Colectar 10 ~ 30 mL de la primera parte del chorro de orina en un contenedor limpio de polipropileno. Cierre y etiquete el contenedor de la muestra. Apéguese a las instrucciones dadas para el almacenamiento y transporte.

Hisopados

Para la toma de hisopados genitales, por favor utilice los siguientes materiales:

- Utilice únicamente hisopos de plástico con punta de Alginato de Calcio ó Dacron, rayón ó hisopos sin aluminio. No utilice hisopos de aluminio ó de madera.
- Los hisopos genitales pueden tomarse y transportarse en 1 ~ 3 mL de los siguientes medios:
  - eNat (Copan)
  - *Flocked swabs* (Copan)
  - Kit de recolección de muestras (Qiagen Corporation)
- Deje el hisopo en el medio de transporte. Cierre y etiquete el contenedor de la muestra. Siga las instrucciones de almacenamiento y transporte.
- Siga las recomendaciones del protocolo para recolectar las células epiteliales escamosas y de columna después remover el moco cervical.

Muestras de citología en base líquida

- Utilice los medios para citología en base líquida ThinPrep® de HOLOGIC® y SurePath® de BD.
- Siga las instrucciones del fabricante para la toma de muestras cervicales en los medios ThinPrep® y SurePath®.

B. Almacenamiento de muestras

La sensibilidad de un ensayo puede disminuir si las muestras son congeladas y descongeladas rutinariamente durante períodos de tiempo prolongados.

Muestras de orina

- Las muestras de orina pueden ser almacenadas a temperatura ambiente (19 ~ 23° C) si la prueba se llevará a cabo en las siguientes 24 horas. Puede guardar las muestras hasta 7 días a 2 ~ 8° C.

Hisopados

- Los hisopos pueden almacenarse a 2 ~ 8° C hasta 7 días si no se procesarán inmediatamente después de la toma de muestra.

Muestras de citología en base líquida

- Las muestras de células cervicales recolectadas en ThinPrep® como medio de transporte pueden almacenarse a 2 ~ 8° C hasta 6 semanas. Las recolectadas en SurePath® pueden almacenarse a 2 ~ 8° C hasta 2 semanas si no se procesarán inmediatamente después de la toma de muestra.

C. Transporte de muestras

Para garantizar una alta calidad de la muestra, se deben ser transportadas tan pronto como sea posible en la temperatura indicada.

Muestras de Orina

- Las muestras de orina pueden almacenarse a 2 ~ 8° C hasta su procesamiento. Asegúrese de conocer todas las regulaciones (locales/nacionales) e instrucciones de laboratorio relevantes con respecto al transporte de materiales etiológicos.

Hisopados

- Los hisopados deberán transportarse a 2 ~ 8° C después de la toma de muestra y de forma previa al traslado al laboratorio.
- Asegúrese de conocer todas las regulaciones (locales/nacionales) e instrucciones de laboratorio relevantes con respecto al transporte de materiales etiológicos.

Muestras de citología en base líquida

- Embalar las muestras cuidadosamente para prevenir fugas y rupturas.
- Las muestras deben transportarse en frio.
- Las muestras deben ser llevadas al laboratorio lo más pronto posible después de la recolección, siguiendo las instrucciones de transporte. Deben cumplir con las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno.

2. Aislamiento de Ácidos Nucleicos

Diversos fabricantes ofrecen kits para aislamiento de ácidos nucleicos. La cantidad de muestra resultante puede variar dependiendo del protocolo utilizado. Los siguientes kits de aislamiento han sido validados para su uso con este kit.

A. Pre-tratamiento de la muestra

Nota: el proceso de pre-tratamiento de la muestra para extraer ácidos nucleicos es el mismo entre los diferentes kits de sistemas de purificación automatizados (SEEPREP12™, MICROLAB Nimbus IVD, MICROLAB STARlet).

Muestras de orina

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (19 ~ 23° C).
- Centrifugar 1 mL de la muestra de orina por 15 minutos a 15,000 x *g* (13000 rpm).
- Descartar el sobrenadante. Re-suspenda de PBS 1X en el agitador *vórtex*.
- Siga el protocolo del fabricante.

Hisopados

- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (19 ~ 25° C).
- Los hisopos colectados en medio de transporte deben ser homogenizados con el agitador *vórtex*.
- Las tapas de los tubos de muestra deben ser removidas cuidadosamente para evitar contaminaciones. Presione el hisopo y el moco contra la pared del tubo para drenar el líquido. Posteriormente, descarte el hisopo y el moco.
- Centrifugue la muestra durante 10 minutos a 5,000 x *g*. (7500 rpm)
- Descarte el sobrenadante. Re-suspenda el *pellet* en 1,000 μL de PBS 1X en el vórtex.
- Tome el volumen recomendado, según el protocolo del fabricante.

Muestras de citología en base líquida

- Equilibre las muestras a temperatura ambiente (19 ~ 25° C).
- Centrifugue 1 mL de la muestra de citología en base líquida durante 15 minutos a 15,000 x *g* (13000 rpm).
- Descarte el sobrenadante. Después resuspender el volumen recomendado en PBS 1X y mezclar en el vórtex.

Siga el protocolo del fabricante.

B. Control Interno

El control Interno (STI-7 IC) se incluye en el kit. Esto le permite al usuario monitorear el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos y la posibilidad de inhibición de la PCR.

- Agregar 10 µL de STI-7 IC a cada mezcla de la solución de muestra y buffer de lisis o directamente al buffer de lisis.

Nota: En el caso de adicionarlo directamente al buffer de lisis, es posible que se formen burbujas, debe ser cuidadoso.

C. Kit de preparación manual

Kit de aislamiento	Fabricante	Vol. recomendado
QIAamp DNA Mini Kit	QUIAGEN	Muestra: 190 µl Elución: 50 µl
Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA extraction kit)	GeneAll	Muestra: 190 µl Elución: 50 µl

D. Sistema de Purificación Automatizado

D-1. SEEPREP12™

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Vol. recomendado
SEEPREP12™	NorDiag	
SEEPREP12™ Viral NA Kit	NorDiag	Muestra: 230 µl Elución: 60 µl

- Adicione 10 µL de proteinasa K (20 mg/ml) de cada tubo de muestra debidamente etiquetado y estéril de 1.5 ml.
- Transfiera 240 µl de muestra (incluyendo 10 µl al tubo STI-7 IC) que contiene 10 µl de proteína K, mezclar el tubo cuidadosamente.
- El cartucho y la bomba montada de punta se colocan en el instrumento.
- Ponga 1.5 ml del tubo de elución dentro del instrumento.
- Presione CONTINUE en la primer pantalla para inicializar el instrumento.
- Presione STAR PROTOCOL en el menú principal del SEEPREP12™.
- En el menú de selección de protocolo, presione “SPN Viral NA-HT”.
- En el menú de selección de **volumen de muestra**, presione “**250 µL**”. Y en la selección de **volumen de elución**, presione “**60 µL**”.
- Siga las instrucciones en pantalla para el montaje del instrumento.

- Una vez que todos los pasos se han completado, cierre la puerta e inicie la corrida.

D-2. MICROLAB NIMBUS IVD

Nota: Mirar el manual de operación del MICROLAB NIMBUS IVD.

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Vol. recomendado
MICROLAB NIMBUS IVD	Hamilton	
STARMag 96 Tissue	Seegene	Muestra: 450 µl Elución: 100 µl

D-3. MICROLAB STARlet

Nota: Observar el manual de operación del MICROLAB STARlet

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Vol. recomendado
MICROLAB STARlet	Hamilton	
STARMag 96 Tissue	Seegene	Muestra: 450 µl Elución: 100 µl

3. Preparación de la PCR en tiempo real

Nota: Deben usarse los tubos y las tapas correctos. (ver MATERIALES REQUERIDOS NO INCLUÍDOS)

Nota: Puntas con filtro resistente a aerosoles y guantes ajustados deben usarse cuando se preparen las muestras. Poner mucho cuidado para evitar las contaminaciones cruzadas.

Nota: Descongele los reactivos por completo en hielo.

Nota: Centrifugue los tubos de reactivos brevemente para remover las gotas del interior de las tapas.

A. Prepare el PCR Mastermix.

5 µL	4X STI-7 TOM
5 µL	Agua libre de RNasa
5 µL	4X Anyplex PCR Master Mix con UDG
15 µL	Volúmen total del PCR Mastermix

Nota: Calcule la cantidad necesaria de cada reactivo basándose en el número de reacciones (muestras + controles).

B. Mezcle por inversión 5 veces ó mediante agitador *vórtex* y centrífugue brevemente.
C. Coloque alícuotas de 15 μL del PCR *Mastermix* en tubos para PCR y cierre las tapas.
D. Agregue 5 μL de cada muestra de ácidos nucleicos a su tubo respectivo.

15 μL	PCR *Mastermix*
5 μL	Muestra de ácidos nucleicos
20 μL	Volumen Total de reacción

Nota: Utilice una punta de pipeta nueva con cada muestra diferente.

Nota: Para el **Control Negativo**, utilice 5 μL de agua libre de RNasa en lugar de muestra de ácido nucleico.

Nota: Para el **Control Positivo**, utilice 5 μL de STI-7 PC

Nota: Evite la contaminación cruzada del PCR Mastermix y las muestras con el Control Positivo.

Nota: En el caso del CFX-96™, no etiquete la tapa de los tubos de reacción ya que la fluorescencia es detectada a través de la tapa.

CONFIGURACIÓN DEL EQUIPO PARA PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Equipo para PCR en tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad)

1.1 Configuración del Equipo para PCR en tiempo real

Nota: La programación del ensayo en el Equipo de PCR en tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad) para la detección de *C. trachomatis* (CT), *N. gonorrhoeae* (NG), *M. genitalium* (MG), *M. hominis* (MH), *U. urealyticum* (UU), *U. parvum* (UP), *T. vaginalis* (TV) y el Control Interno (IC) puede dividirse en los siguientes pasos:

A. Programación del protocolo

1) En el menú principal, haga clic en Protocol para abrir la ventana de Experiment Setup.

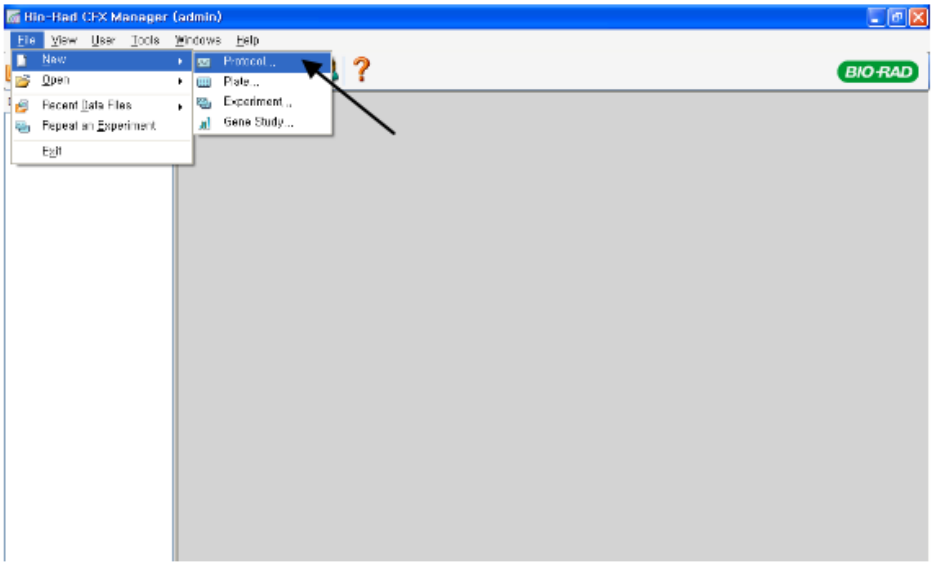


Fig. 1. ***Programación del Protocolo****. Realice un nuevo protocolo ó cargue un protocolo ya existente para el experimento.*

2) En *Protocol Editor*, defina el perfil térmico como se menciona a continuación:

Segmento	No. De ciclos	Temperatura	Duración
1	1	50 °C	4 min
2	1	95 °C	15 min
3	30	95 °C	30 seg
4		60 °C	1 min
5		72 °C	30 seg
6	1	55 °C	30 seg
7	1	Curva de fusión 55 °C ~ 85 °C (5 s / 0.5 °C)	
8	10	95 °C	30 seg
9		60 °C	1 min
10		72 °C	30 seg
11	1	55 °C	30 seg
12	1	Curva de fusión 55 °C ~ 85 °C (5 s / 0.5 °C)	
13	10	95 °C	30 seg
14		60 °C	1 min
15		72 °C	30 seg
16	1	55 °C	30 seg

17	1	Curva de fusión 55 °C ~ 85 °C (5 s / 0.5 °C)

Nota: Lectura de placa en el segmento 7, 12 y 17. Fluorescencia es detectada durante el punto de fusión.

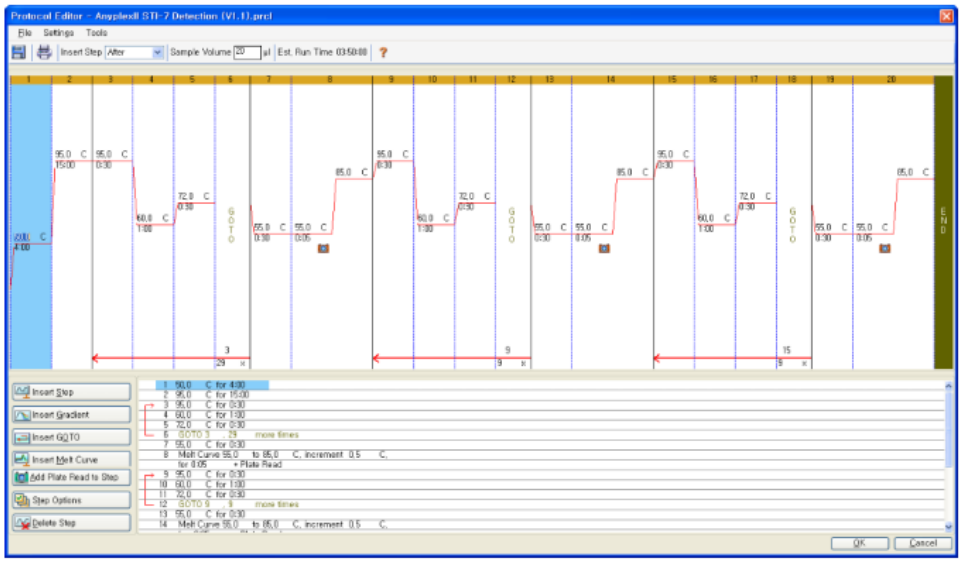


Fig. 2. ***Protocol Editor***

3) Haga clic en *Sample Volume* y modifique el valor a 20 μL.
4) Haga clic en *OK*; se abrirá la ventana *Experiment Setup*.

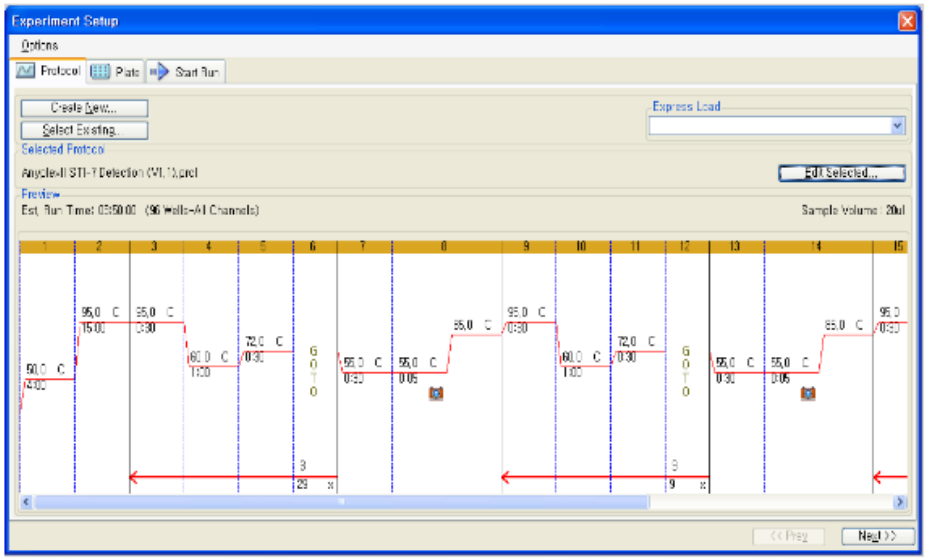


Fig. 3. ***Experiment Setup Protocol.***

B. Programación de la placa

1) En *Experiment Setup Plate*, haga clic en *Create New* para abrir la ventana *Plate Editor* para crear una nueva placa.

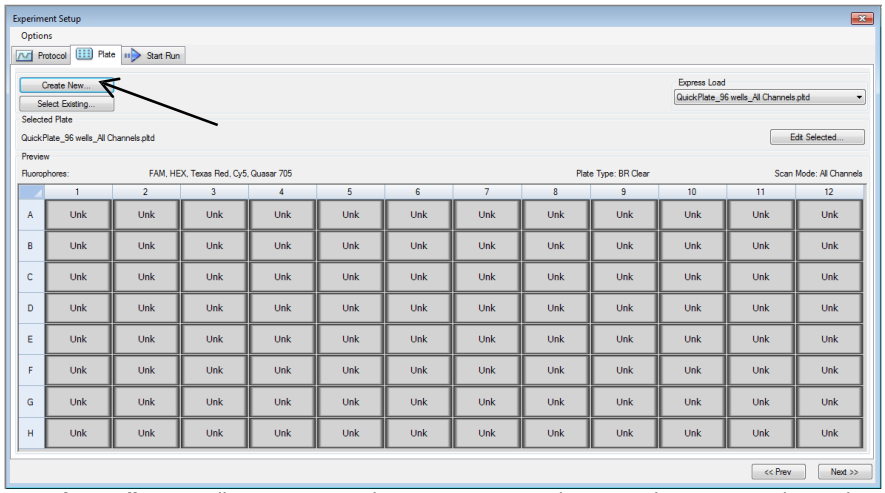


Fig. 4. ***Plate Editor****. Realice una nueva placa o cargue una placa ya existente para el experimento.*

2) Haga clic en *Select Fluorophores* para indicar los fluoróforos (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670) que serán utilizados en el experimento.

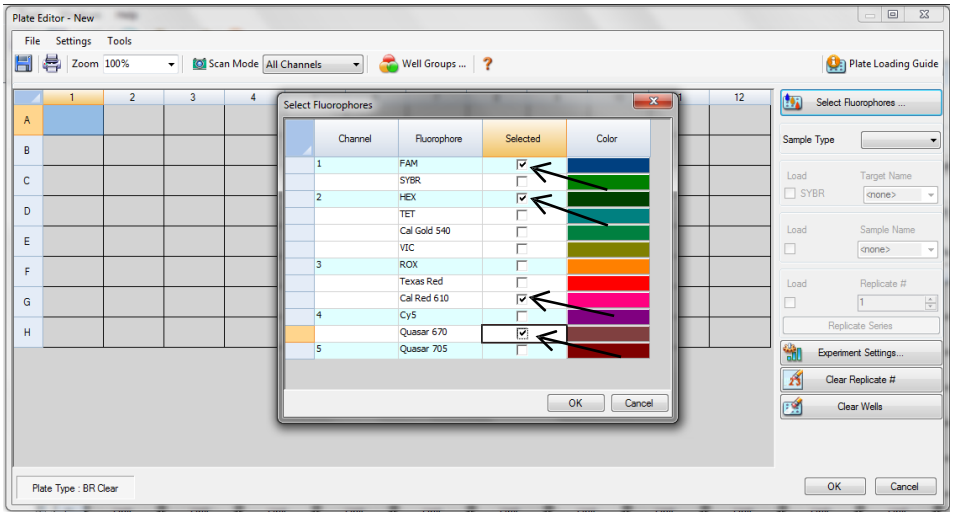


Fig. 5. ***Select Fluorophores****. (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670)*

4) Seleccione los pocillos y haga clic en *Sample Type* en el menú desplegable.
   - **Unknown**: Muestras clínicas
   - **Negative Control**
   - **Positive Control**

5) Haga clic en las casillas de verificación apropiadas (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670) para cargar los fluoróforos en los pocillos seleccionados.

6) Escriba el nombre de la muestra en *Sample Name* y presione *Enter*.

7) En Settings del menú principal del Plate Editor, elija el tamaño del plato (Plate size) y el Tipo de Placa (Plate Type) (BR White)

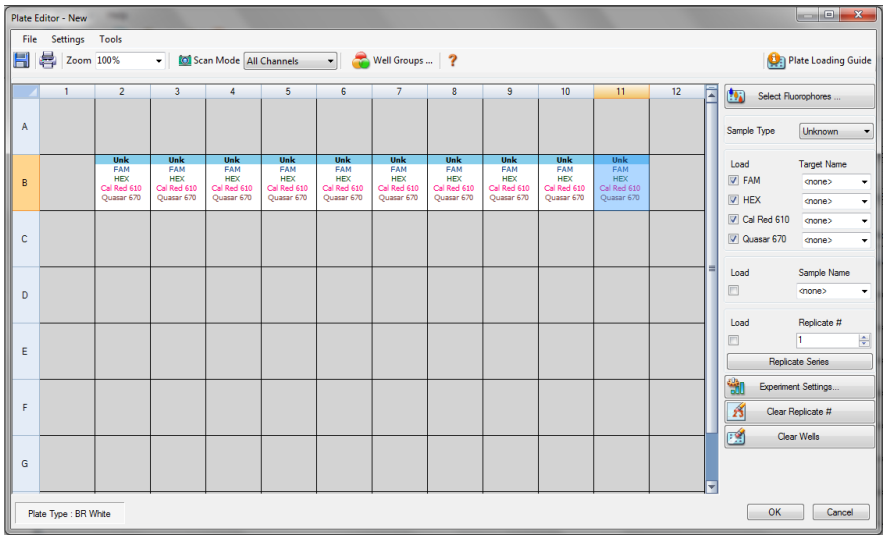


Fig. 6. ***Plate Setup****.*

8) Haga clic en *OK*, y guarde la nueva placa agregada al archivo.

9) Se abrirá la ventana de *Experiment Setup*.

Fig. 7. ***Experiment Setup Plate.***

C. Inicio del ensayo

1) En *Experiment Setup Start Run*, haga clic en *Close Lid* para cerrar la tapa del equipo.

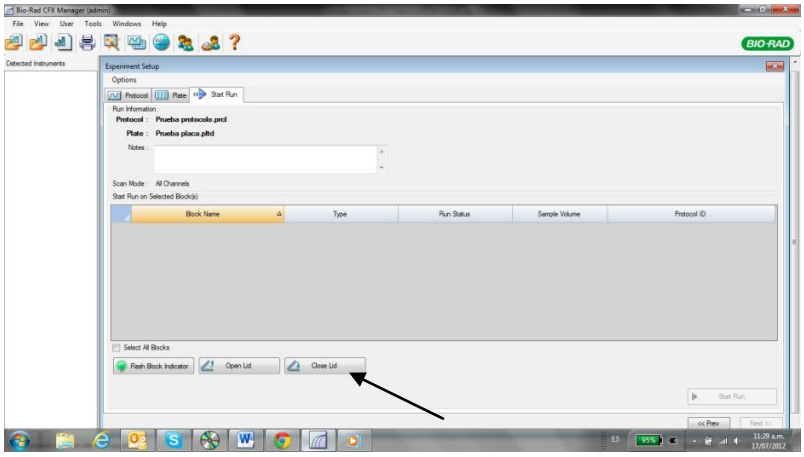


Fig. 8. ***Close Lid.***

2) Haga clic en *Start Run*.

3) Guarde el archivo del ensayo en la carpeta que usted designe. Llene en el archivo el nombre y de click en SAVE, y la máquina dará inicio.

1.2 Análisis de datos

A. Crear una carpeta específica para guardar los datos (DATA)

1) Para salvar los datos de cada punto de resultados del archivo, cree tres carpetas.
2) El nombre de la carpeta por guardar del primer punto de fusión es “1”, el nombre de la segunda carpeta es “2”, y el tercer nombre es “3”.

B. Pre-ajustes para el análisis de datos en el CFX-96

1) Después del ensayo, haga clic en la pestaña *Melt curve* para confirmar los resultados de los picos de las curvas.

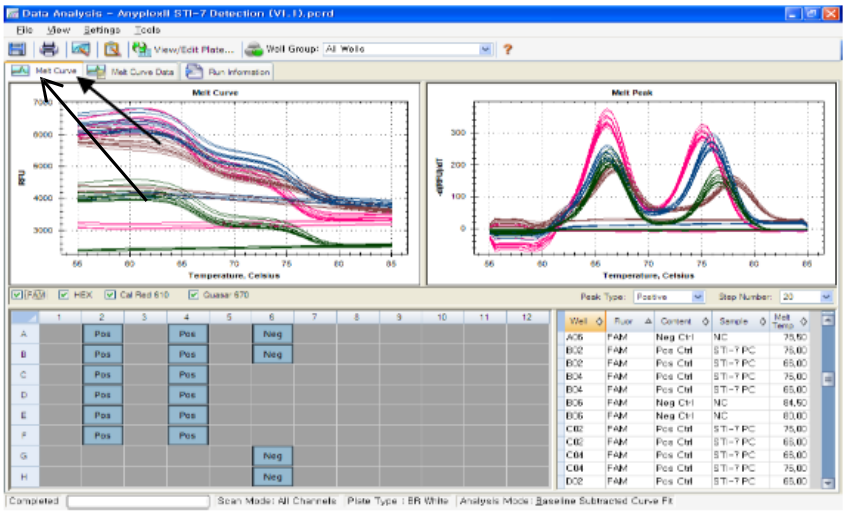
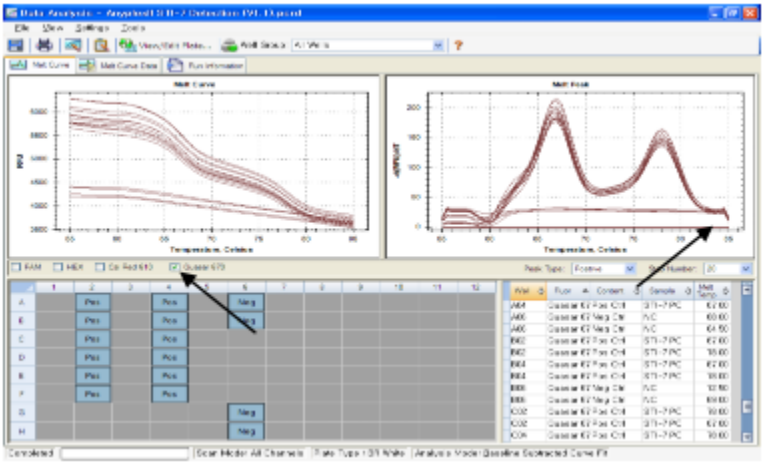
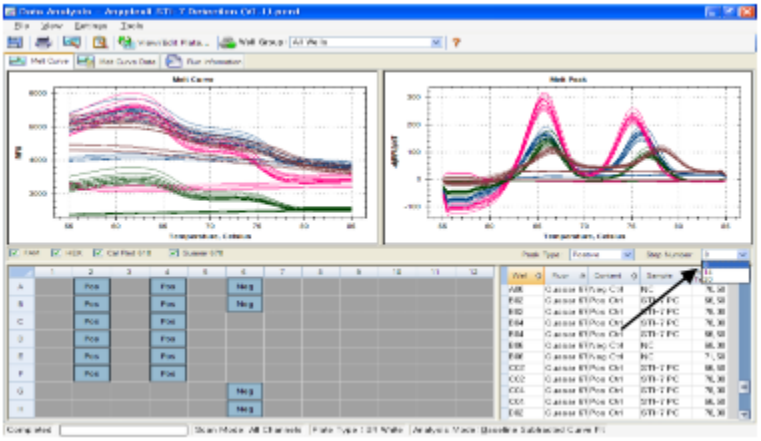


Fig. 9. Resultados de los picos de las curvas de disociación.

2) Seleccione solo Quasar 670, el umbral de pico de fusión debe ser ajustado a cero.



3) De click en el paso número “8” y seleccione *Export All Data Sheets to Excel* en el menu *Tools*.



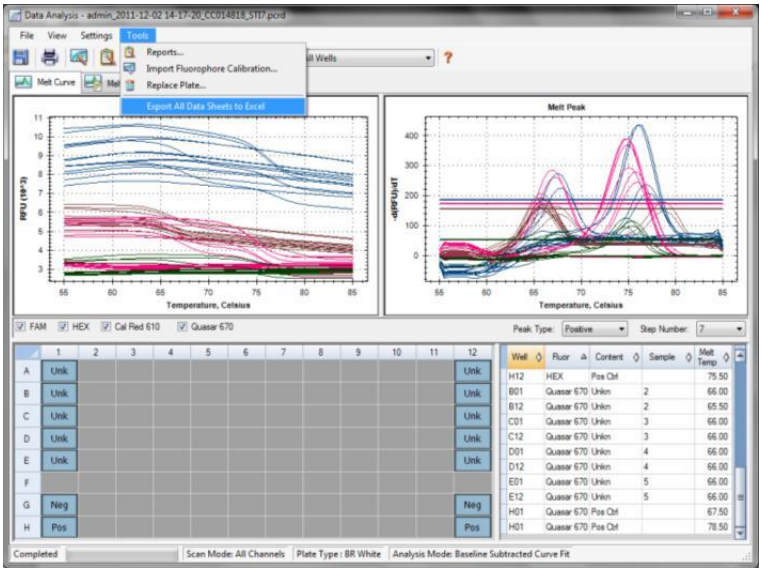


Fig.11. ***Exports All Data Sheets to Excel***

3) Guarde los resultados de la carpeta “1”, cuando una nueva ventana se abra.

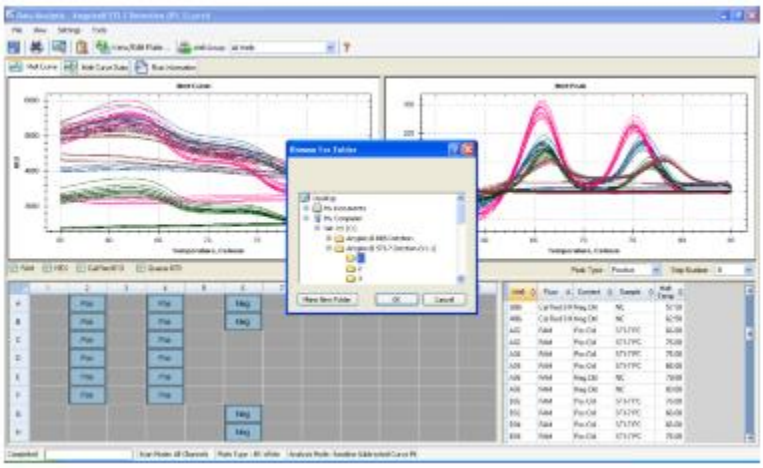


Fig. 12. ***Exporte todos los datos en hojas de cálculo en el análisis de datos de la carpeta designada****.*

5) Verifique que los resultados se guardaron en la ubicación designada.

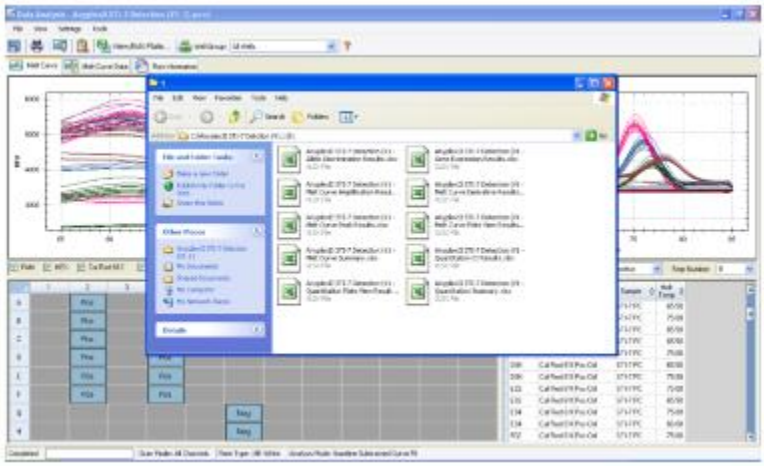


Fig. 13. ***Archivos de resultados exportados****.*

6) Regrese al paso 3) y seleccione el paso número “14”. Repita los pasos 4) y 5) y guarde los datos en la carpeta “2”. Luego vuela al paso 3) y seleccione el paso número “20”. Repita los pasos 4) y 5) y guarde los datos en la carpeta “3”. Los datos de cada paso es guardado como se muestra a continuación.

Numero de paso	Carpeta designada
8	1
14	2
20	3

B. Ajustes para el análisis de datos en el *Seegene Viewer*

1) Abra en pantalla el programa *Seegene Viewer*, haga clic en *Open* para encontrar los archivos guardados.

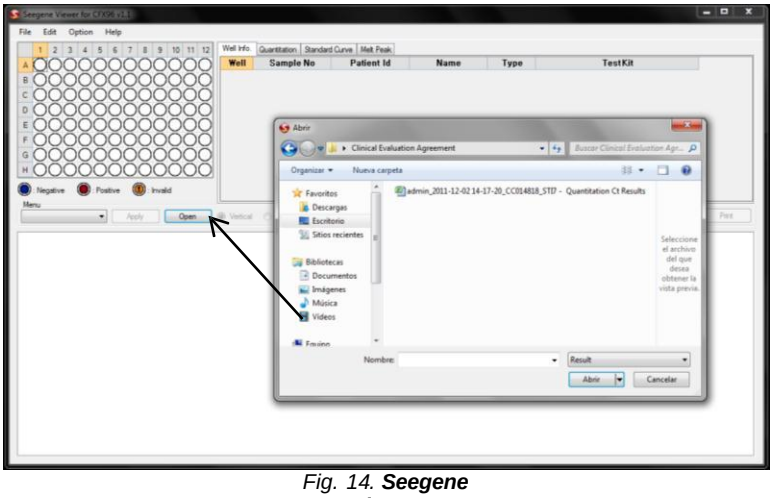


Fig. 14. ***Seegene viewer***

2) Después de abrir el archivo de resultados:

① Seleccione los pocillos de las muestras

② Haga clic en la columna Menú y seleccione la prueba realizada de las opciones de la lista

③ Haga clic en Apply para obtener el resultado final

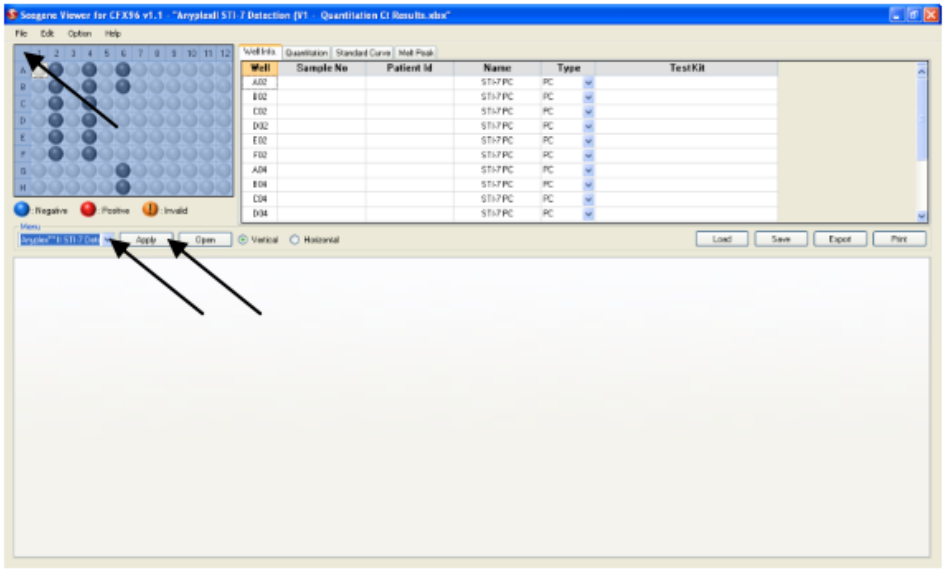


Fig. 15. Ajustes para el análisis de datos en el Seegene viewer

3) Verifique el resultado en cada pozo.

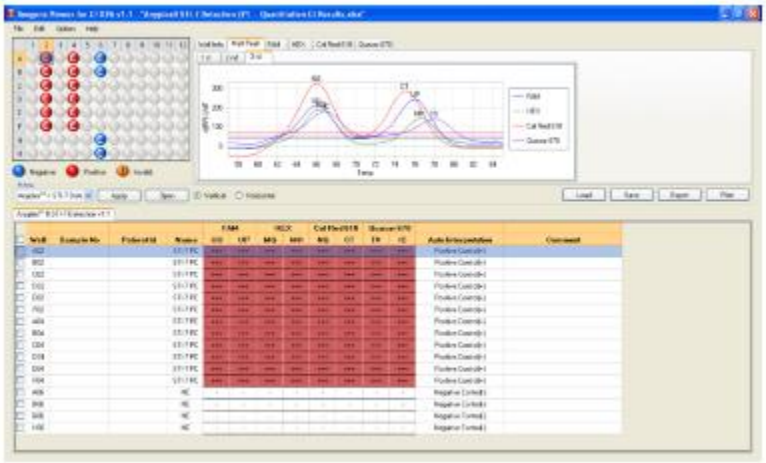
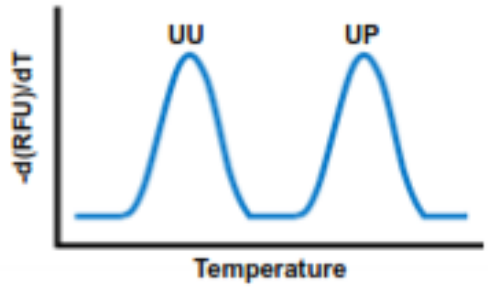
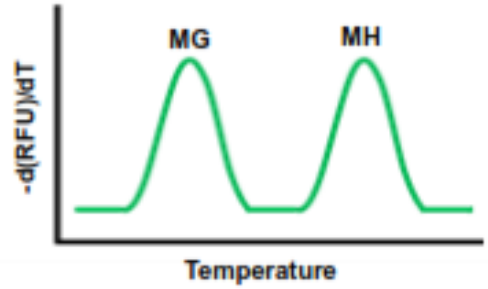
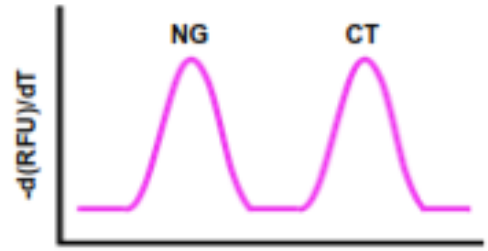
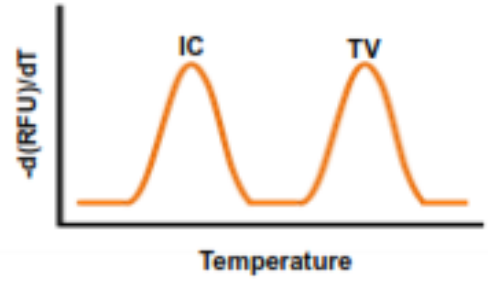


Fig. 16. ***Resultados de la prueba en el CFX-96 mediante el Seegene viewer***

RESULTADOS

1. Información del analito

Fluorophore	Anyplex™ II STI-7 Detection
FAM	
HEX	
Cal Red 610	
Quasar 670	

2. Interpretación de Resultados

Resultados	Resultado Control Interno*	Interpretación
+++ o ++ o +	+++ o ++	ADN de objetivo detectado.
+++ o ++ o +	+ o -	ADN de objetivo detectado.
-	+++ o ++	ADN de objetivo no detectado.
-	+ o -	**Inválido** - Señal débil o negativa del control interno es indicativa de una toma de muestra inadecuada, o errores en el procedimiento o presencia de inhibidores. - Procese otra alícuota de la muestra original y repita la prueba.

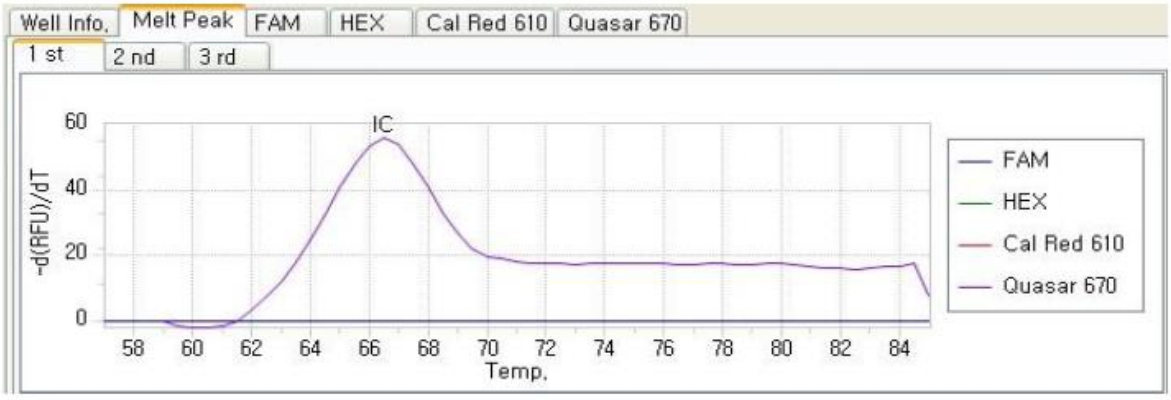
Result	cyclic-CMTA (cyclic Catcher Melting Temperature Analysis)		
	First CMTA point	Second CMTA point	Third CMTA point
+++	+	+	+
++	-	+	+
+	-	-	+
-	-	-	-

- El control Interno y otras señales no observadas: ver Solución de Problemas, *TROUBLESHOOTING*).

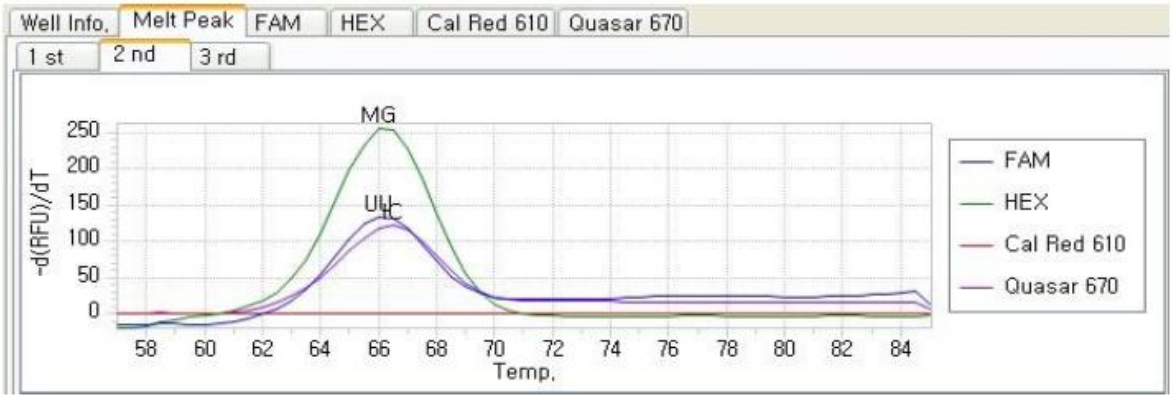
La detección del Control Interno (IC) en el canal de detección del Quasar 670 no es requerida para resultados positivos. Títulos elevados de otros analitos pueden conducir a una reducción o ausencia de la señal del Control Interno.

1.4 Aplicación a Muestras Clínicas

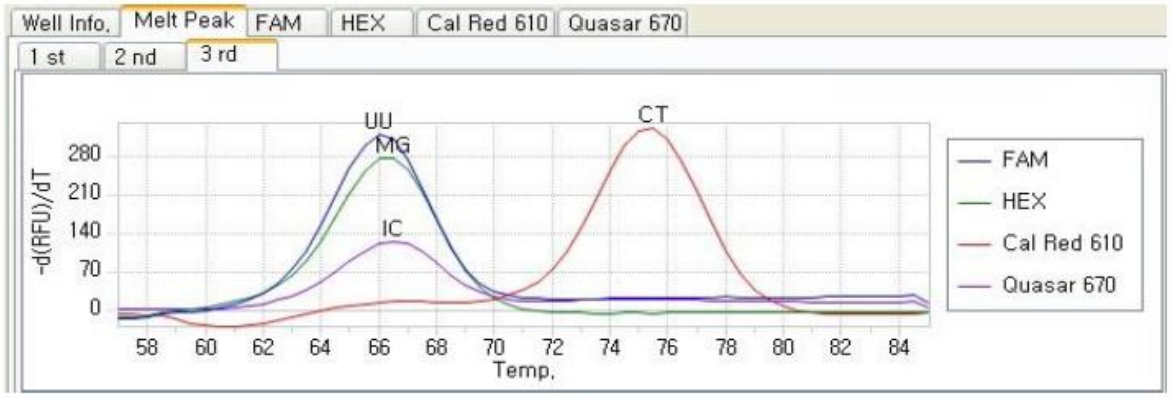
<Muestra 1>
Pico de fusion-1ro (primer punto CMTA)



Pico de fusion-2do (Segundo punto CMTA)



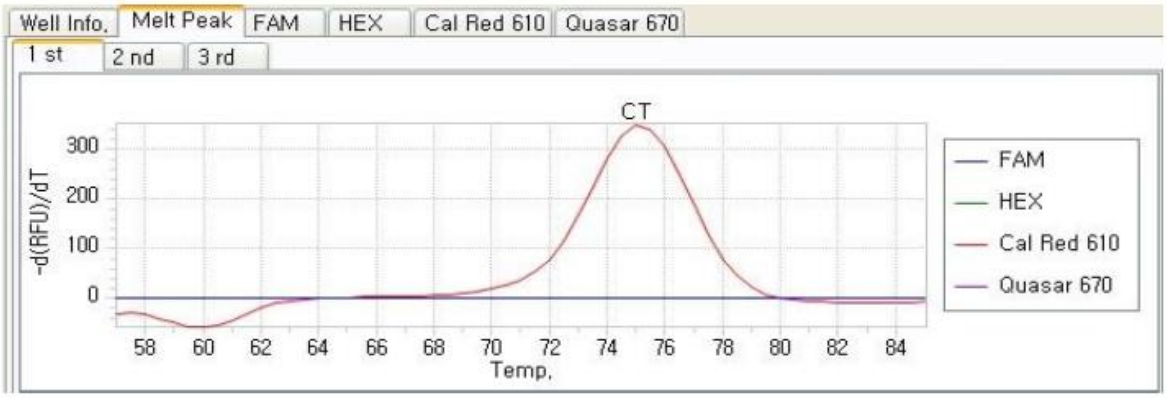
Pico de fusion-3ro (Tercer punto CMTA)



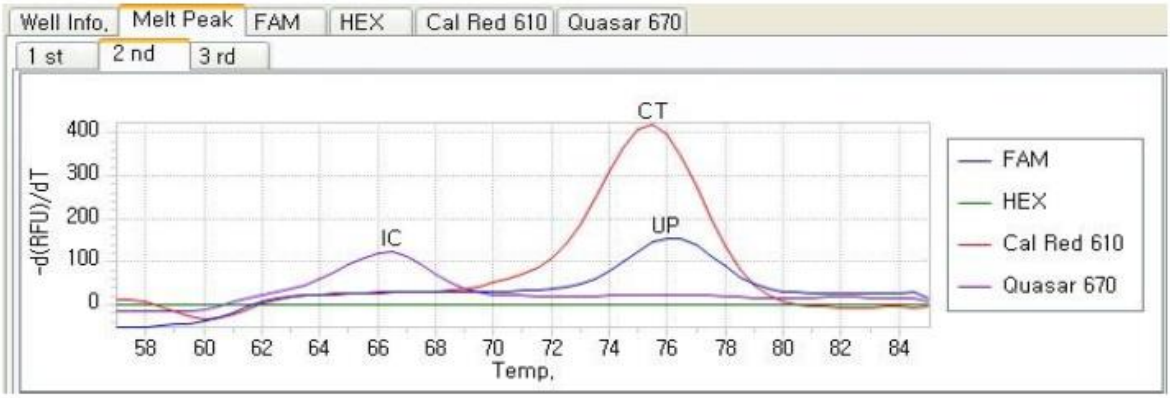
Name	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670		Auto Interpretation
	UU	UP	MG	MH	NG	CT	TV	IC	
1	++	-	++	-	-	+	-	+++	UU, MG, CT

<Muestra 2>

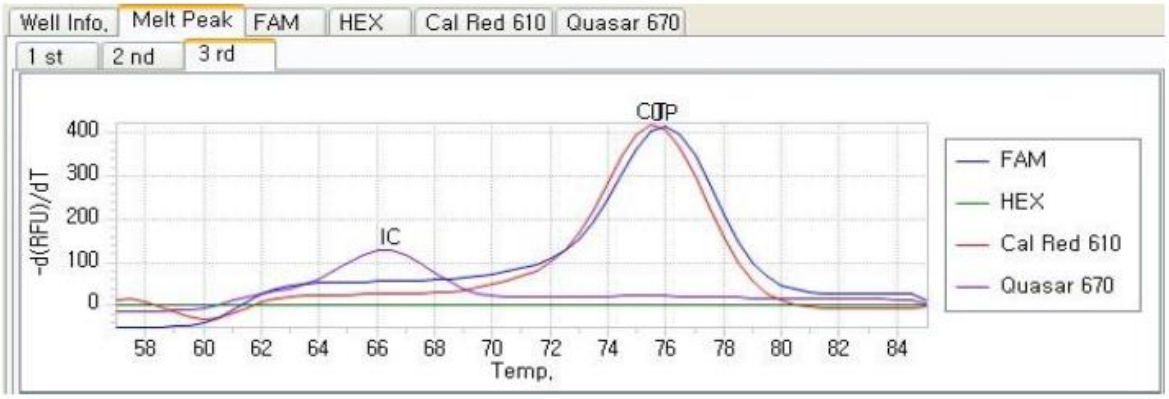
Pico de fusion-1ro (primer punto CMTA)



Pico de fusion-2do (Segundo punto CMTA)



Pico de fusion-3ro (Tercer punto CMTA)



Name	FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670		Auto Interpretation
	UU	UP	MG	MH	NG	CT	TV	IC	
1	-	++	-	-	-	+++	-	++	UP, CT

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Anyplex™ STI-7 Detection		
OBSERVACIONES	**CAUSAS DEL PROBLEMA**	**SOLUCIÓN**
No se observa la señal del Control Interno ni ninguna otra señal.	Los fluoróforos para el análisis de datos no cumplen con el	Seleccione los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Ciclos de PCR y/o temperaturas en el equipo incorrectos.	Verifique las condiciones de la PCR y repita con los ajustes adecuados de ser necesario.
	Los reactivos permanecierona temperatura ambiente por un tiempo prolongado o se almacenaron en condiciones incorrectas.	Verifique las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (ver la etiqueta en el kit) de los reactivos, utilice un kit nuevo de ser necesario.
	Programación incorrecta.	Repita el procedimiento de detección con los ajustes adecuados.
	Extracción de ADN fallida.	Si el Control Interno fue adicionado previo a la extracción, la ausencia de señal del Control Interno puede indicar la pérdida de ácidos nucleicos durante la extracción. Asegúrese de utilizar los métodos de extracción recomendados. La muestra debe ser diluida con *buffer* PBS de 1/10 veces y después se agrega el STI-7 IC a la muestra diluida.
La señal del control interno no es observada.	Alta carga del ácido nucleico del patógeno.	Si la señal del objetivo es observada, es probable que sea positiva para el patógeno, aunque la señal del control interno no se observe. Si desea verificar el control interno, diluya el ácido nucléico en D.W. esterilizada (10-100X), y repita el paso de PCR con el ácido nucleico diluido.
	Presencia de inhibidores de PCR.	Diluya el ácido nucleico aislado en D.W. estéril (10-100x), y repita la PCR con el ácido nucleico diluido. (Si la muestra está todavía presente, reinicie desde la extracción de ácido nucleico)
Falsos positivos o señal observada en el control Negativo.	Presencia de contaminación cruzada.	Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas con filtro durante el procedimiento de extracción. Cambie puntas entre tubos. Repita el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos con un nuevo set de reactivos.

Falso negativo o no se observa señal en los controles positivos	Error en la toma de muestra.	Tome una nueva muestra.
	Almacenamiento incorrecto de la muestra.	Tome una nueva muestra y repita el procedimiento completo, Asegure que la muestra sea almacenada en las condiciones apropiadas.
	Error en la extracción de ácido nucleico.	Repita la extracción del ácido nucleico.
	Error en la adición del ácido nucleico al tubo de PCR correspondiente.	Verifique el número de muestras, asegure que se adicione el ácido nucleico al tubo de PCR correcto durante el proceso de detección.
	Presencia de inhibidores.	Diluya el ácido nucleico en D.W. estéril (10-100X) y repita el paso de PCR con el ácido nucleico diluido. (si aún está presente la muetsra, reinicie desde la extracción de ácido nucleico)
	Los fluoróforos para el análisis de datos no cumplen con el protocolo.	Seleccione los fluoróforos correctos para análisis de datos.
	Programación incorrecta.	Repita la PCR con la configuración corregida.
	Mezcla de reacción de PCR incorrecta.	Verifique que todos los componentes se hayan adicionado. Cada reactivo se debe homogenizar y centrifugar para que el contenido de las tapas baje, antes de la hacer la mezcla.
	Se dejaron los reactivos por largo tiempo a temperatura ambiente o se almacenaron en condiciones no apropiadas.	Verifique la fecha de vencimiento de los reactivos, y use uno nuevo si es necesario.

DESEMPEÑO

1. **Especificidad**: La alta especificidad del kit Anyplex II STI-7 está garantizada por los cebadores específicamente diseñados para los objetivos de interés y las condiciones de reacción. Anyplex II STI-7 ha sido probado para reactividad cruzada en 69 diferentes patógenos.

Organism	Strain No.	Test result†
Chlamydia trachomatis (serotype A)	ATCC VR-571B	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype B)	ATCC VR-573	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype Ba)	ATCC VR-347	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype C)	ATCC VR-1477	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype D)	ATCC VR-885	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype E)	ATCC VR-348B	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype F)	ATCC VR-346	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype G)	ATCC VR-878	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype H)	ATCC VR-879	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype I)	ATCC VR-880	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype J)	ATCC VR-886	CT Detected
Chlamydia trachomatis (serotype K)	ATCC VR-887	CT Detected
Lymphograunoma Venereum (LGV I)	ATCC VR-901B	CT Detected
Lymphograunoma Venereum (LGV II)	ATCC VR-902B	CT Detected
Lymphograunoma Venereum (LGV III)	ATCC VR-903	CT Detected
Neisseria gonorrhoeae	ATCC 700825	NG Detected
Ureaplasma urealyticum	ATCC 33695	UU Detected
Ureaplasma parvum	ATCC 27815	UP Detected
Mycoplasma genitalium	ATCC 33530	MG Detected
Mycoplasma hominis	ATCC 23114	MH Detected
Trichomonas vaginalis	ATCC 30001	TV Detected
Acinetobacter baumannii	ATCC 15308	Not detected
Acinetobacter schindleri	KCTC 12409	Not detected
Acinetobacter ursingii	KCTC 12410	Not detected
Atopobium vaginae	ATCC BAA-55	Not detected
Bacteroides caccae	KCTC 5132	Not detected
Bacteroides fragilis	ATCC 25285D	Not detected
Bacteroides vulgatus	KCCM 11423	Not detected
Candida albicans	ATCC 10231D-5	Not detected
Candida dubliniensis	KCTC 17427	Not detected
Candida glabrata	ATCC 36909D	Not detected

Organism	Strain No.	Test result
Candida krusei	KCCM 50633	Not Detected
Candida parapsilosis	KCCM 50271	Not Detected
Candida tropicalis	KCCM 32005	Not Detected
Chlamydophila pneumoniae	ATCC VR-1360	Not Detected
Chlamydophila psittaci	ATCC VR-125	Not Detected
Clostridium difficile	ATCC 9689	Not Detected
Clostridium perfringens	ATCC 13124	Not Detected
Cytomegalovirus (CMV)	ATCC VR-807	Not Detected
Enterococcus avium	ATCC 49603D	Not Detected
Epstein Barr Virus	ATCC VR-602	Not Detected
Escherichia coli	ATCC 15469	Not Detected
Gardnerella vaginalis	ATCC 49145D	Not Detected
Haemophilus ducreyi	ATCC 700724D-5	Not Detected
Haemophilus influenzae	ATCC 51907D	Not Detected
Hepatitis B virus (HBV)	BBI A325-5723	Not Detected
Hepatitis C virus (HCV)	BBI A306-6515	Not Detected
Herpes Simplex Virus, type I	ATCC VR-206	Not Detected
Herpes Simplex Virus, type II	ATCC VR-734	Not Detected
Human Papilloma Virus 16	ATCC 45113D	Not Detected
Human Papilloma Virus 18	ATCC 45152D	Not Detected
Mobiluncus curtisii	ATCC 35241	Not Detected
Mobiluncus mulieris	ATCC 35240D-5	Not Detected
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 29342	Not Detected
Neisseria cinerea	ATCC 14685	Not Detected
Neisseria meningitidis	ATCC 700532D	Not Detected
Neisseria mucosa	ATCC 19696	Not Detected
Neisseria perflava	ATCC 14799D-5	Not Detected
Neisseria sicca	ATCC 5415	Not Detected
Neisseria subflava	ATCC 19243	Not Detected
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 47085	Not Detected
Salmonella enteritidis	KCCM 12021	Not Detected
Salmonella typhimurium	KCCM 40253	Not Detected
Staphylococcus aureus	ATCC 700699D-5	Not Detected
Streptococcus agalactiae	ATCC BAA-611D	Not Detected
Streptococcus pneumoniae	ATCC BAA-255D	Not Detected
Treponema pallidum	Clinical Isolate	Not Detected
Vibrio parahaemolyticus	ATCC 27969	Not Detected
Yersinia enterocolitica	ATCC 23715	Not Detected

- Para verificar la veracidad de los resultados, el experimento fue repetido tres veces.

2. **Sensibilidad**
   Para determinar la sensibilidad de la prueba Anyplex STI-7 Detection, se hicieron diluciones seriadas estándar de 10^5 a 10^{-1} copias de ADN objetivo clonado por reacción, y fue analizado con el Anyplex STI-7 Detection.

Límite de detección para la sensibilidad es 10 copias/reacción (2 patógenos)

Chlamydia trachomatis
Neisserieae gonorrhoeae

Limite de detección para la sensibilidad es de 50 copias/reacción (5 patógenos)

Ureaplasma urealyticum
Ureaplsma parvum
Mycoplasma genitalium
Mycoplasma hominis
Trichomonas vaginalis

3. **Reproducibilidad**
   La prueba de reproducibilidad usando como referencia la cadena mostrada de reproducibilidad con diferentes lotes de productos, diferentes experimientos, diferentes tiempos y diferentes lugares, confirmaron la significancia de la reproducibilidad del Anyplex STI-7 Detection.

REFERENCIAS

1. A. I. Mata, A. Gibello, A. Casamayor, M. M. Blanco, L. Domínguez, and J. F. Fernández-Garayzabal. 2004. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish. Appl Environ Microbiol. 70(5): 3183-3187.
2. Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, and Christiansen G. 2004. Development of real-time PCR for detection of Mycoplasma hominis. BMC Microbiol. 6; 4: 35.
3. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, and Barrett JB. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. JCM. P. 3558-3565 Vol. 42, No. 8.
4. Kong F, and Gilbert GL. 2004. Postgenomic taxonomy of human ureaplasmas – a case study based on multiple gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 54(Pt 5): 1815-21.
5. Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, and Gaydos CA. 1998. Diagnosis of Trichomonas vaginalis Infection by PCR Using Vaginal Swab Samples. JCM. 36(11): 3205-10.
6. Svenstrup HF, Jensen JS, Björnelius E, Lidbrink P, Birkelund S, and Christiansen G. 2005. Development of a Quantitative Real-Time PCR Assay for Detection of Mycoplasma genitalium. JCM. 43(7): 3121-8.
7. Mahony JB, Luinstra KE, Tyndall M, Sellors JW, Krepel J, and Chernesky M. 1995. Multiplex PCR for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Genitourinary Specimens. JCM. P. 3049-3053 Vol. 33, No. 11.
8. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, and Kim JK. 2007. Dual priming oligonucleotide system for multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. Nucleic Acids Res. 35(6): e40.
9. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, and Garaizar J. 2004. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of Salmonella in Human Clinical Samples. JCM. 42(4):1734-8.
10. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, and Venezia RA. 2004. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas. JCM. 42(4): 1528-33.
11. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, and Weiss JB. 1996. Simultaneous PCR Detection of Haemophilus ducreyi, Treponema pallidum, and Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 from Genital Ulcers. JCM. 34(1): 49-54.
12. Blaylock MW. Musatovova O, Baseman JG, and Baseman JB. 2004. Determination of Infectious Load of Mycoplasma Genitalium in Clinical Samples of Human Vaginal Cells. JCM. 42(2):746-52.
13. Hamasuna R, Osada Y, and Jensen JS. 2005. Antibiotic Susceptibility Testing of Mycoplasma genitalium by TaqMan 5 Nucloease Real-Time PCR. Antimicrob Agents Chemoter. 49(12): 4993-8.
14. Vinayagamoorthy T, Mulatz K, and Hodkinson R. 2003. Nucleotide Sequence-Based Multitarget Identification. JCM. 41(7):3284-92.
15. Chun Y, and Yin ZD. 1998. Glycogen Assay for Diagnosis of Female Genital Chalmydia trachomatis Infection. JCM. 36(4): 1081-2.

SIMBOLOGÍA

Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas y el manual.

Símbolo	Explicación
IVD	Para Diagnóstico in vitro
LOT	Número de Lote
REF	Número de catálogo
	Fecha de vencimiento
	Temperatura de Almacenamiento
	Precaución
PRIMER	Mezcla de oligonucleotidos para amplificación y detección
WATER	Agua libre de Rnasas
CONTROL +	Control Positivo
CONTROL IC	Control Interno
PREMIX	Mezcla Maestra para PCR Anyplex
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Consulte instrucciones de uso

INFORMACIÓN DE PEDIDO

No. de Catálogo Serie Anyplex™ STI	Producto	Tamaño
SD7700Y	**Anyplex™ II STI-7 Detection**	**50 rxns**
SD7200Y	Anyplex™ CT/NG Real-time Detection	50 rxns*
SD7201Y	Anyplex™ TV/MH Real-time Detection	50 rxns*
SD7300Y	Anyplex™ MG/UU/UP Real-time Detection	50 rxns*

***En el caso del equipo SmartCycler® II, el número total de reacciones se reduce. (50 rxns → 40 rxns)**

Seeplex® STI Series		
SD6600Y	Seeplex® STD6 ACE Detection (V2.0)	50 rxns
SD6511Y	Seeplex® STI Master Panel 1 (V2.0)	50 rxns
SD6510X	Seeplex® STI Master ACE Detection (MP1 ~ MP5)	100 rxns X 5
SD6511X	Seeplex® STI Master Panel 1 (MP1)	100 rxns
SD6512X	Seeplex® STI Master Panel 2 (MP2)	100 rxns
SD6513X	Seeplex® STI Master Panel 3 (MP3)	100 rxns
SD6514X	Seeplex® STI Master Panel 4 (MP4)	100 rxns
SD6515X	Seeplex® STI Master Panel 5 (MP5)	100 rxns

Productos accesorios		
SG1701	Ribo_Spin vRD	50 prep

Sistemas de Purificación Automaticos

SPN1200	SEEPREP12™	EA
SPN1004	SEEPREP12™ VIRAL NA Kit	96 preps
SPN1101	SEEPREP12™ Tip Set	96 puntas
65415-02	MICROLAB NIMBUS IVD	EA
173000-075	MICROLAB STARlet	EA
744300.4	STARMag 96 Tissue	384T / 1 caja